

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-285875

(43) 公開日 平成7年(1995)10月31日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/64	A B F	7431-4C		
39/00	H			
	D			
49/00	A			
// C 0 7 G 17/00	Z			
審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 5 頁)				

(21) 出願番号	特願平6-80269	(71) 出願人	594067623 早崎 峯夫 東京都立川市若葉町2の26の8
(22) 出願日	平成6年(1994)4月19日	(72) 発明者	早崎 峯夫 東京都府中市幸町3の5の8 東京農工大 学内
特許法第30条第1項適用申請有り 平成5年10月20日 日本獣医師会発行の「日本獣医師会雑誌 Vol. 46 No. 10 1993」に発表		(72) 発明者	秋山 祐子 東京都府中市幸町3の5の8 東京農工大 学内
		(72) 発明者	紺野 克彦 東京都府中市幸町3の5の8 東京農工大 学内
		(74) 代理人	弁理士 鈴江 武彦
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ノミアレルゲンの製造方法および該方法により製造されるノミアレルゲン

(57) 【要約】

【構成】 生理食塩水中において、ノミ虫体をまずティッシュホモジナイザーで磨砕し、次いで超音波細胞破壊装置で細胞レベルまで破砕する。その後、高速遠心装置にて不溶成分と可溶成分とに分離して不溶成分を除去する。

【効果】 ノミアレルギーの診断および治療のいずれにも用いることができる。また、減感作療法を、アナフィラキシーなどの生体を重篤な状態に追いやる副作用を生じることなく行なうことができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】緩衝液中において、ノミ虫体をまず機械的に、次いで超音波を用いて破砕してホモジネートを得、その後、該ホモジネートを遠心して不溶成分を分離することを具備するノミアレレルゲンの製造方法。

【請求項2】請求項1記載の方法により製造されるノミアレレルゲン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、ノミアレレルギーの診断および治療に用いることができるノミアレレルゲンの製造方法およびこの方法により製造されるノミアレレルゲンに関する。

【0002】

【従来の技術】アレレルギー性疾患は、ヒトやイヌ、ネコ、ヒツジ、ウマ、ウシなどの多くの動物種に発生する疾患である。一般に、アレレルギーは、特定の異種タンパクが導入されて感作された状態にある生体に、再び同一の異種タンパクが生体内に侵入した際に呈する異常反応であると理解されている。この場合の異種タンパクはアレレルゲンと呼ばれ、種々の物質がアレレルゲンになり得ることが知られている。

【0003】家畜類においても種々のアレレルゲンが認められているが、とりわけノミに由来するアレレルゲン、すなわちノミアレレルゲンによるアレレルギーは広く一般に見受けられ、家畜類の健康上の大きな問題となっている。このようなアレレルギー性疾患は、例えば、イヌにおいてはアレレルギー性皮膚炎として認められることが多い。

【0004】従来、このようなアレレルギー性疾患の治療法としては、抗アレレルギー剤や抗ヒスタミン剤を用いる対症療法、免疫グロブリンや金製剤を用いる変調療法、原因アレレルゲンを投与する減感作療法などが知られている。このうち、減感作療法は、アレレルギーの原因となっているアレレルゲンを生体にごく少量注射し、漸次その量を増加させて、そのアレレルゲンに対する生体の過敏性を除去・減弱させる方法であり、アレレルギーの治療法として好ましい方法であるとされている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】上記ノミアレレルギーに対しても減感作療法は好ましい療法であると考えられるが、この療法に用いられるノミアレレルゲンは現在製造されていない。また、減感作療法は、注射後短時間から2～3日にわたる臨床症状の激化、注射部位の局所反応（疼痛性または無痛性の浮腫や搔痒症）、アナフィラキシーショックなど、時には被検体を重篤な状態に迫りやる危険性のある副作用を呈することがある。

【0006】したがって、この発明は、ノミアレレルゲンの簡便な製造方法であって、得られたノミアレレルゲンがアナフィラキシーショック等の生体にとって危険な副作用を呈することがない製造方法を提供することを目的と

する。また、この発明は、上記製造方法により製造されるノミアレレルゲンを提供することをも目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】この発明によるノミアレレルゲンの製造方法は、緩衝液中において、ノミ虫体をまず機械的に、次いで超音波を用いて破砕してホモジネートを得、その後、該ホモジネートを遠心して不溶成分を分離することを特徴とする。

【0008】また、この発明によるノミアレレルゲンは、緩衝液中において、ノミ虫体をまず機械的に、次いで超音波を用いて破砕してホモジネートを得、その後、該ホモジネートを遠心して不溶成分を分離することにより得られることを特徴とする。

【0009】この発明による製造方法においては、まず、緩衝液中において、ノミ虫体を機械的に磨砕し、次いで超音波を用いて細胞レベルまで破砕してノミ組織のホモジネートを得る。ここで用いられる緩衝液としては、通常この分野において用いられるいかなる緩衝液をも用いることができるが、得られたアレレルゲンを生体内に注射することを考慮すると生理食塩水もしくは緩衝生理食塩水を用いることが好ましい。また、使用するノミの種は特に限定されるものではなく、治療対象とする動物に通常寄生するものを任意に用いることができる。

【0010】ノミ虫体を機械的に磨砕する手段は特に限定されるものではなく、当該分野において通常用いられるいかなる手段をも用いることができ、例としてティッシュホモジナイザーを挙げることができる。また、超音波を用いてノミ組織を破砕する手段も特に限定されるものではなく、市販の超音波細胞破壊装置を好適に用いることができる。

【0011】ノミ組織のホモジネートが得られた後、このホモジネートを遠心にかけて可溶成分と不溶成分とに分離し、不溶成分を除去して可溶成分、すなわち上清のみを採取する。遠心の条件は、可溶成分と不溶成分とが完全に分離し得るものであれば特に限定されるものではないが、高速回転で、具体的には12,000rpm程度で行なうことが好ましい。

【0012】このようにして得られた上清は、そのままノミアレレルゲンとしてヒトやイヌ、ネコ、ヒツジ、ウマ、ウシ等の家畜類のノミアレレルギーの診断や治療に用いることができるが、さらに、適当な手段により殺菌することが好ましい。この上清の殺菌は、例えば、滅菌用フィルターで濾過滅菌した後、65℃程度の低温で1時間程度インキュベーターに静置して低温加熱殺菌することにより行なうことができる。

【0013】このノミアレレルゲンを用いたノミアレレルギーの診断は、以下の通りに行なうことができる。まず、上記方法により得られた上清を、生理食塩水等で適切な濃度、通常1:1,000重量/容量(W/V)に調整する。次に、この希釈溶液を、陽性対照および陰性対照と

共に被検動物の皮内に注射する。所定時間の後、各々の注射部位に生じた膨疹を計測し、それぞれの計測値を比較して所定の基準により陽性並びに陰性の判定を行なう。

【0014】また、このノミアレルゲンは、アレルギーの治療、すなわち減感作療法に用いることができる。その際、ノミアレルゲンは、上記アレルギー皮内検査用いる場合よりもさらに希釈し、通常 1:5,000 W/V 程度で用いられる。減感作療法は、希釈ノミアレルゲンを所定の期間被検動物の皮下に注射することにより行なうことができる。ノミアレルゲン液の投与量、投与期間等は、治療対象となる動物により適宜設定され、具体的には、対象動物がイヌの場合には、1頭につき濃度 1:5,000 W/V のノミアレルゲン液 1ml を毎週 1回ずつ、計12回投与することを標準治療法とする。

【0015】なお、従来市販されているアレルギー診断薬並びに治療薬は、数十回分をまとめてバイアル瓶に収容して製品化されており、必要に応じて注射器で採取し、残りは冷蔵庫等の冷所に保管する方式を採っている。しかしながら、この方式では長期間使用中に雑菌が混入する恐れが高く、そのため、アレルギー液中に雑菌の増殖防止のための防腐剤、通常 0.5% 程度のフェノールが添加されているが、これは皮膚局所における炎症反応を抑制して皮膚反応の測定の正確性を低下させる恐れがある。また、使用の度に低温から室温までの温度変化を受けるため、アレルギーの活性が低下する恐れもある。したがって、この発明によるノミアレルゲンは、防腐剤を添加することなく 1回使用量をアンプルに収容することが好ましい。

【0016】

【実施例】以下、この発明を実施例によってより詳細に説明する。

A. ノミアレルゲンの調製

アレルギーの調製には犬から採取したノミ成虫を用いた。採取したノミには、形態学的にイヌノミとネコノミが確認され、これらが任意に混合していた。

【0017】これらのノミ成虫に、ノミの重量に対して 1:1,000 W/V (重量/容量) の濃度となるように 0.5% フェノール添加生理食塩水を加え、ティッシュ・グラインダ (tissue grinder) を用いて 4℃ で 15 分間ホモジナイズした後、超音波細胞破碎装置を用いて氷冷下で 15 分間超音波暴射 (50W) を行ない、さらに 12,000 rpm で 60 分間高速遠心分離を行なった。

【0018】その後、上清を滅菌用フィルター (ポアサイズ: 0.22 μm) で濾過滅菌し、得られた濾液を滅菌バ

イアルに分注して 65℃ で 1 時間放置した後 4℃ で保存した。

B. 被検犬のアレルギー皮内検査

皮膚病発症犬に、上記 A で調製したノミアレルゲン液 (1:1,000 W/V)、陽性対照液 (10,000 倍リン酸ヒスタミン・0.5% フェノール添加生理食塩水) および陰性対照液 (0.5% フェノール添加生理食塩水) をそれぞれ注射し、15 分後に発赤を伴う膨疹の計測 (長径×短径) を行なった。その結果、ノミアレルゲン液による膨疹の測定値が、陰性対照液による測定値と陽性対照液による測定値との中間値以上の値を示した反応を陽性と判定した。

C. 減感作療法

減感作療法には、上記 A で調製したノミアレルゲン液 (1:1,000 W/V) を陰性対照液で 5 倍に希釈 (1:5,000 W/V) して用いた。このノミアレルゲン液 1ml を、上記 B の検査により陽性と判定された犬 9 頭 (雄 4 頭、雌 5 頭) の背部皮下に 3~4 カ所に分けて注射した。投与は 1 週間隔で行ない、12 回を原則とした。ただし、9 頭のうち、3 頭については投与を 4 回で中止し、また 1 頭については 12 回の投与では症状の改善が見られなかったため 18 回投与を行なった。

【0019】アレルギー液注射時には、全身アナフィラキシーショックの発生に備えてノルエピネフリンやコルチコステロイドを用意した。また、アレルギー液注射後は、原則として約 30 分間動物を観察し、激しい運動は避けるようにした。

D. 評価

ノミアレルゲンの評価は、減感作療法を施した被検犬の皮膚症状の推移、ノミアレルゲンに対する間接赤血球凝集 (IHA) 抗体価の変化、およびブラウスニツ・キュストナー (Prausnitz-Kustner) (P-K) 反応により行なった。

i) 皮膚症状の推移

皮膚症状は、下記表 1 に示す Halliwell REW: J Am Anim Hosp Assoc, 17, 249-253 (1981) に記載の方法に従って数値化し、その推移を見た。減感作療法後に症状の改善を認めたものを減感作療法に対する応答例とし、応答率を算出した。

【0020】また、下記式を用いて皮膚症状の改善率を算出した。

改善率 = (実施後の皮膚症状の等級 / 実施前の皮膚症状の等級) × 100

結果を下記表 2 に示す。

【0021】

表 1 皮膚症状の重篤度分類

等 級	症 状
0	正常犬

- 1 0と2の間
- 2 丘疹を伴う軽度の掻痒症
- 3 2と4の間
- 4 痂皮を伴う広範囲の丘疹、発赤と掻痒症による自虐性損傷
- 5 4と6の間
- 6 苔癬化を伴う広範囲の脱毛、発赤と掻痒症による顕著な自虐性損傷
- 7 6と8の間
- 8 全身にわたる病変、激しい掻痒症、広範囲の丘疹、持続性の自虐性損傷

表2 減感作療法による皮膚症状の変化

番号	犬種	年齢	性別	注射	皮膚症状重篤度		皮膚症状の
				回数	実施前	実施後	改善率 (%)
1	甲斐犬	11	雄	18	4	4	0
2	柴 犬	14	雌	4	3	3	0
3	柴 犬	5	雌	4	2	0	100
4	雑 種	2	雌	12	4	0	100
5	雑 種	11	雌	12	5	1	80
6	ビーグル	7	雌	12	6	4	33
7	柴 犬	7	雄	12	4	1	75
8	雑 種	8	雄	12	2	1	50
9	柴 犬	2	雄	4	3	3	0
平均				3.7	1.9	48.6	

表2から明らかなように、治療前の重篤度は平均 3.7 (2~6) であったのに対して治療後は平均 1.9 (0~4) であり、症状が軽減している。また、症状の改善を示したものは 9頭中 6頭であって応答率は67%であり、これら 6頭に限ってみると平均改善率は73% (33~100%)、うち 5頭 (83.3%) は50%以上の改善率を示した。残りの 3頭については、症状の改善は見られなかったが、症状が悪化した例はなかった。

【0022】また、投与回数別にみると、4回投与した3頭のうち症状が改善されたのは1頭であり (応答率33.3%)、その1頭の改善率は100%であった。これに対し、12回および18回投与した6頭のうち改善がみられたのは5頭であり (応答率83.3%)、この5頭の平均改善率は67.6%であった。

ii) IHA抗体価の変化

IHA反応は、Hayasaki M: Jpn J Vet Sci, 43, 21-26 (1981) に記載の方法に従って行なった。

【0023】減感作療法前後のIHA抗体価は、1号犬および9号犬で1:2倍から1:4倍へ、3号犬で1:2倍から1:8倍へとわずかな上昇が認められた。また、4号犬では1:2倍から1:4倍、6号犬では1:4倍から1:8倍とそれぞれわずかに上昇したものの、治療後は治療前と同一の抗体価に戻った。さらに、2

号犬 (1:2倍)、5号犬 (1:4倍)、7号犬 (1:16倍)、8号犬 (1:4倍) では抗体価の変動は認められなかった。

【0024】このように、アレルゲン投与によって抗体価の上昇が認められたのは3頭であったが、抗体価の上昇時期と症状の改善時期との間には明確な相関は見られなかった。

iii) ブラウスニッツ・キュストナー (P-K) 反応
P-K反応は、減感作療法実施前および実施後6週の被検血清について測定した。レシピエント犬には、試験に用いる前約1年半の間閉鎖環境下の犬舎内で飼育し、外部寄生虫および腸内寄生虫陰性、犬糸状虫未感染で、被毛色が白色または淡黄色の健康な成犬2頭を用いた。

【0025】測定は、まずレシピエント犬をペントバルビタールで全身麻酔した後背部から腹部にかけて剪毛し、次に剪毛部に3~4cm間隔で被検血清を0.1mlずつ皮内注射し、さらに72時間後に、無麻酔下においてノミアレルゲン液 (1:1,000W/V) を0.1mlずつ血清注射部位に皮内注射することにより行なった。

【0026】判定は、アレルゲン注射の15分後の計測値が、陽性および陰性対照液の中間値以上の値を示す反応を陽性とし、抗体価は陽性反応における最大血清希釈倍数をもって表わした。

【0027】その結果、4号犬では療法前に 1:8 倍を示したが、5週後に反応陰性となり、この時期に皮膚症状の改善も認められた。また、6号犬では、療法前は反応陰性で 5週後に 1:128 倍と上昇したが、皮膚症状の改善は 8週後から見られ、以後11週まで漸次改善され、11週後の抗体価は 1:8 倍であった。残りの 3、5、7 および 8号犬では減感作療法期間を通して反応陰性であった。このように、皮膚症状の改善に伴う P-K 抗体価の減少が 2例に認められた。

フロントページの続き

(72) 発明者 大石 勇
東京都府中市幸町 3 の 5 の 8 東京農工大
学内

【0028】

【発明の効果】以上のように、この発明の製造方法によると、アナフィラキシーショック等の重篤な副作用を生じることなく減感作療法に用いることが可能なノミアレルゲンを容易に製造することが可能となる。また、このようにして製造したこの発明のノミアレルゲンは、濃度を調整することにより、ノミアレルギーの診断および治療のいずれにも好適に用いることができる。